

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18863

研究課題名(和文) 増殖性網膜硝子体疾患におけるRGS5の役割解明と革新的分子標的治療の展開

研究課題名(英文) Elucidation of the role of RGS5 in proliferative vitreoretinal diseases and development of innovative molecular targeted therapy

研究代表者

梅野 有美 (Umeno, Yumi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30795737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：増殖糖尿病網膜症(PDR)におけるRGS5発現の検討を行った。PDR患者の線維血管増殖膜(FVM)と硝子体液を採取した。対照群に特発性網膜前膜患者の検体を用いた。免疫染色によりFVMのRGS5とSMAが共染した。RGS5のmRNA発現レベルは対照群よりもFVMが高値であった。ELISAにより硝子体液におけるRGS5とペリオスチンの濃度を定量した。RGS5濃度は対照群よりもPDR患者が高値であった。FVMを伴うPDR患者のRGS5濃度は伴わない患者よりも高値であり、RGS5とペリオスチンの間に相関はなかった。PDRにおけるRGS5のペリオスチンとは独立した線維血管増殖促進への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖糖尿病網膜症(PDR)のような増殖性網膜硝子体疾患に対する治療としては光凝固術、抗VEGF薬硝子体内注射や硝子体手術が行われている。しかし、線維血管増殖の抑制効果は限定的であり視機能を維持できない症例も多く存在する。RGS5は病的血管の周皮細胞に特異的に発現することが想定され、網膜線維血管増殖においてVEGFと異なる機能を有していると考えられる。RGS5の増殖糖尿病網膜症における役割解明とRGS5標的分子標的薬を創製できれば、抗VEGF薬と相加的効果をもたらすことが期待される。また、今回の研究で得られる結果は血管新生緑内障の病態解明につながる契機となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The expression of RGS5 in proliferative diabetic retinopathy (PDR) was investigated. Fibrovascular membranes (FVM) and vitreous humor were collected in patients with PDR. Samples were collected in patients with epi-retinal membrane as controls. Immunostaining showed co-staining of RGS5 and SMA in FVMs. The mRNA expression levels of RGS5 were significantly higher in FVMs compared with controls. The concentration of RGS5 and periostin in the vitreous humor was detected by ELISA. The concentration of RGS5 was significantly higher in PDR patients compared with controls. Among PDR patients, the concentration of RGS5 was significantly higher in eyes with FVM than in eyes without FVM and mean RGS5 level and periostin level were not correlated. Our results suggested that RGS5 may be involved in the development of FVM independently of periostin associated with PDR.

研究分野：眼科学関連

キーワード：RGS5 網膜上増殖組織 増殖糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

後天視覚障害の主な原因となっている加齢黄斑変性、増殖糖尿病網膜症 (PDR) や増殖硝子体網膜症などの増殖性網膜硝子体疾患では、網膜の上下に生じる線維 (血管) 増殖組織 (以下増殖組織) が主要病態である。これは一種の創傷治癒反応の過程であるが、その分子機序は殆ど不明である。増殖組織が眼内で過剰におこると眼内出血や牽引性網膜剥離を引き起こすため難治で、視機能を低下させる。治療は網膜光凝固術、抗 VEGF 薬硝子体内注射や硝子体手術が行われているが、視機能を維持できない症例も多く存在する。人口の高齢化に伴い今後も増殖性網膜硝子体疾患の患者数は増加すると予想され、増殖組織の病態に基づいたより良い治療法の確立が社会的急務である。

Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5) は G タンパク質共役受容体を介する情報伝達を抑制する細胞内調節因子ファミリー蛋白質の 1 つで、病的腫瘍新生血管に特異的に発現し癌や創傷治癒への関与が報告されている。しかし、眼内増殖性疾患における分子機序はほとんど明らかでなく、同様の結果が得られれば新たな分子標的治療の開発へつながることが期待される。

2. 研究の目的

増殖性網膜硝子体疾患の 1 つで神経網膜の表面に線維血管増殖膜 (FVM) が形成される PDR について、RGS5 の発現の局在と活動性との相関を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 被験者

患者本人に今回の研究に対する十分なインフォームドコンセントを行い、採取した検体を本研究に用いることについて同意が得られた患者のみを対象とした。また、本研究の実施にあたっては、事前に久留米大学医に関する倫理委員会 (迅速審査) の審査と承認を得た (研究番号 20013)。手術標本はヘルシンキ宣言に基づいて取り扱われた。研究対象者の基準は、FVM 内に活動性の新生血管を伴う牽引性網膜剥離、活動性の新生血管を伴う繰り返す硝子体出血、網膜光凝固療法追加が不可能な硝子体出血を伴うルベオーシスであった。除外基準は、腎疾患または血液疾患、尿毒症、化学療法の既往、生命維持療法、糖尿病以外の慢性異常であった。

硝子体手術の開始時に、未希釈の硝子体液 (0.5-1.0mL) を標準化された条件で吸引し、直ちに無菌チューブに移した。検体を 4°C で 3000rpm (1630g) の 10 分間遠心分離し、上清を一定分量に分け、分析まで -80°C で保存した。硝子体液は患者 25 人 30 眼から採取した (年齢: 63.5 ± 13.4 歳、男性 16 人、女性 9 人)。対照として、特発性網膜前膜 (ERM) のために硝子体手術を受けた患者 28 人 30 眼から採取した (年齢、67.3 ± 11.3 歳、男性 14 人、女性 14 人)。これらの患者の臨床的特徴は TABLE1 のようになった。PDR 患者 8 人 8 眼を対象に、外科的に網膜表面から FVM を切除した。対照として、5 人 6 眼の ERM 患者の検体を使用した。切除した FVM と ERM のうち 6 検体は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) に用いた。残り 2 検体の FVM は免疫組織化学に用いた。

TABLE1. Clinical and Laboratory Data of Patients

| Characteristic | PDR | ERM |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| Age, y | 63.5 ± 13.4 | 67.3 ± 11.3 |
| Sex, n | | |
| Male | 16 | 14 |
| Female | 9 | 14 |
| HbA1c, % | 7.8 ± 1.5 | - |
| Subgroups, n (%) | | |
| Panretinal photocoagulation history | 23 (77) | - |
| Vitreous hemorrhage | 24 (80) | - |
| Fibrovascular membranes | 18 (60) | - |
| Traction retinal detachment | 7 (23) | - |

(2) 免疫組織化学

免疫組織化学は基本的にマニュアル記載通りに実施した。外科的に切除された FVM を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、リン酸緩衝生理食塩水中でパラフィンに埋め込んだ。厚さ (3 μm) に薄切した連続切片からパラフィンを除去し、親水化させた。

① 酵素免疫染色

RGS5 に対する染色では抗原賦活化は行わず、スキムミルクで 3 時間ブロッキングを行った。α SMA に対する染色では抗原賦活化をクエン酸緩衝液でマイクロウェーブ処理することで行った。RGS5 の一次抗体 (RGS5 Antibody OTI1C1 NBP2-00880、1:150 希釈) または α SMA の一次抗体 (α-Smooth Muscle Actin D4K9N XP® Rabbit mAb、1:200 希釈) を室温の加湿チャンバーで 15 分間インキュベートした。結合した一次抗体は、RGS5 を CSA II キット (CSA II Biotin-free Tyramide Signal Amplification System) で、α SMA を Refine キット (Bond ポリマーシステム) によって検出し染色を行った。

② 蛍光免疫二重染色

賦活化はクエン酸緩衝液でマイクロウェーブ処理をすることで行った。RGS5 の一次抗体を室温の加湿チャンバーで 15 分間インキュベートし、Opal™ 4-Color Manual IHC Kit を使用して検出

した。再びクエン酸緩衝液でマイクロウェーブ処理を行い、 α SMA の一次抗体を室温の加湿チャンバーで 15 分インキュベートし、同キットを使用して検出した。その後、核を DAPI で染色した。切片を蛍光顕微鏡(キーエンス)で観察した。

(3) RNA 抽出

RT-PCR 用に採取した FVM と ERM は -80°C で保存した。それぞれの検体から抽出試薬(TRIZOL® Reagent)を用いて、マニュアルに従いホモジナイザー(Dispergierantrieb T10 basic)でホモジナイズし RNA を分離した。クロロホルムを加えて 2 相分離した後、水相をイソプロピルアルコールで沈殿させ RNA を抽出した。得られた RNA のゲル状ペレットを 75%エタノールで洗浄し水に溶解させ、 -80°C で凍結した。RNA の濃度および品質は分光法 (ND-2000 分光光度計; NanoDrop Technologies, Willmington, DE, USA) により評価した。

(4) 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

FVM と ERM における RGS5 遺伝子を定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)で検証した。RGS5 と β アクチンの cDNA 配列に基づく合成オリゴヌクレオチドプライマープライマーには次のものを使用した 5'-AAGATGGCTGAGAAGGCAAA-3' (RGS5_F)、5'-TCAGGGCATGGATTCTTTTC-3' (RGS5_R)、5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' (ACTB_F)、5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3' (ACTB_R)。RNA の逆転写には RT-PCR 用の一本鎖 cDNA 合成キット(SuperScript™ VIL0™ cDNA Synthesis Kit)を用いた。cDNA に、マニュアル通り PCR 試薬(PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix)と 0.5pmol のプライマーペアを混合し 20 μL の PCR 反応液を調整した。RT-qPCR にはサーマルサイクラー(StepOnePlus Real-Time PCR System; Applied Biosystems)を使用し、 95°C で 7 分間の熱変性させた後、40 回の PCR サイクルを行った。各サイクルは 95°C で 60 秒間の熱変性、 60°C で 30 秒間のアニーリング、および 72°C で 120 秒間の伸長反応とした。mRNA の発現レベルは β アクチンに対する蛍光強度から推定した。

(5) 硝子体液の ELISA

採取した PDR 患者と ERM 患者の硝子体液は 1:10 希釈したものを使用し、RGS5 およびペリオスチンの濃度をサンドイッチ ELISA キット(RGS5; Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For RGS5, ペリオスチン; Periostin ELISA Kit)によって測定した。濃度は、マイクロプレートリーダー(Multiskan™ FC 吸光マイクロプレートリーダー)を用いて、波長 450nm の吸光度を測定することで決定した。

(6) 統計解析

統計解析は、商用統計ソフトウェアパッケージ(JMP, version 15.1)を使用して行った。最初にデータの分散性を Shapiro-Wilk 検定で解析した。異なるグループ間における RGS5 発現レベルをウィルコクソンの符号順位検定で解析した。RGS5 とペリオスチンの間に相関関係が存在するかどうか検討するために、RGS5 およびペリオスチン濃度の測定値を常用対数スケールに変換し、ピアソンの相関係数で解析した。両側検定 $P < 0.05$ は統計的に有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) PDR 患者 FVM における RGS5 の局在

FVM における RGS5 の局在を決定するために、FVM の切片を RGS5 抗体で酵素免疫染色した。RGS5 抗体は、FVM 中の α SMA を特異的に標識した(Figure 1)。

次に、FVM の切片を RGS5 と α SMA の抗体で蛍光免疫二重染色した。その結果、FVM における RGS5 と α SMA が共染した(Figure 2)。

FIGURE 1

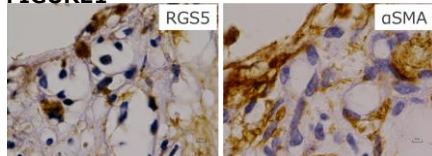
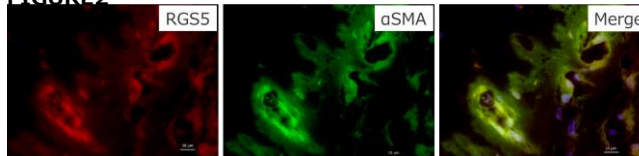
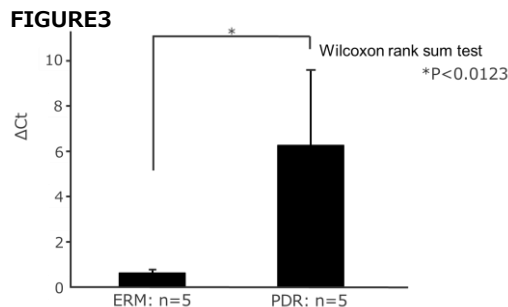


FIGURE 2



(2)PDR 患者 FVM と ERM における RGS5 の mRNA 発現レベルの比較

それぞれの検体から抽出した RNA に対して RT-qPCR を行った。RGS5 の mRNA は対象となった PDR 患者から得られた FVM 6 検体のうち 5 検体から検出されたが、対照の ERM ではほとんど検出されなかった (FIGURE3)。RGS5 の mRNA 発現レベルは、ERM よりも FVM の方が高値であった ($P < 0.0123$)。

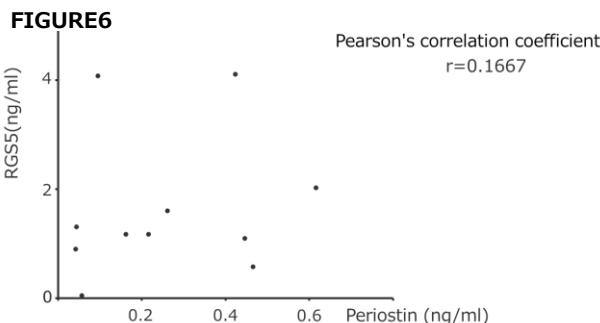
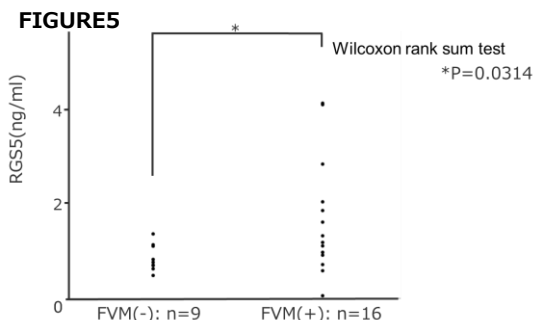
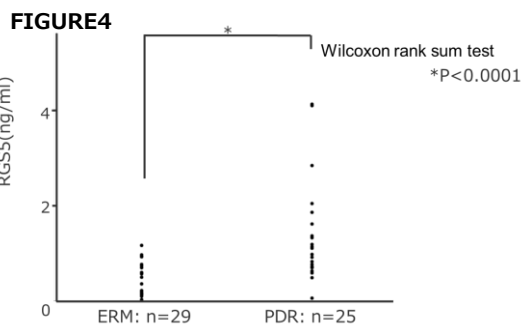


(3)PDR 患者の硝子体液における RGS5 とペリオスチンの濃度

硝子体手術の開始時に採取した PDR 患者の硝子体液 30 検体と、ERM 患者の硝子体液 30 検体から RGS5 の濃度を調べた (FIGURE4)。硝子体液における RGS5 の濃度は、PDR 患者の方が ERM 患者と比較して高値であった ($P < 0.0001$)。

FVM では RGS5 の mRNA 発現レベルが上昇し、対照の ERM ではほとんど検出されなかったことから (FIGURE3)、RGS5 は FVM の形成に特異的に関連しているのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するために、PDR 患者について FVM を有する患者と FVM を有さない患者に細分化して検討した (FIGURE5)。その結果、明らかな FVM を伴う PDR 患者の硝子体液における RGS5 の濃度は、伴わない患者よりも高値であった ($P < 0.05$)。

また、FVM を伴う PDR 患者の硝子体液における RGS5 とペリオスチンの濃度について相関関係を検討したが、RGS5 とペリオスチンの硝子体濃度の間には統計的に有意な相関関係は認められなかった (FIGURE6)。



以上のように、FVM における RGS5 の免疫組織化学的解析では、 α SMA 陽性細胞が染色され、これらの細胞は FVM の血管周皮細胞または筋線維芽細胞である可能性が高いことが示された。また、PDR に伴う FVM では、RGS5 の発現が特異的に亢進していた。その一方で PDR 患者の硝子体液における RGS5 の濃度は、ERM 患者よりも高値であった。また、PDR 患者の硝子体液における RGS5 の濃度は、FVM の存在と有意に相関していた。これらの結果から、RGS5 は FVM の発生や維持に特異的な役割を果たしている可能性が示唆された。PDR 患者では、硝子体液における RGS5 とペリオスチンの濃度に相関を認めなかったことから、FVM の発生や増殖促進において、RGS5 はペリオスチンとは独立して関与している可能性が示唆された。

今回の研究成果は、増殖性網膜硝子体疾患に対する新たな分子標的治療の開発のための重要なヒントになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yoshida Shigeo, Umeno Yumi, Haruta Masatoshi | 4. 巻 1132 |
| 2. 論文標題 Periostin in Eye Diseases | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol | 6. 最初と最後の頁 113 ~ 124 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-13-6657-4_12 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号） | 所属研究機関・部局・職 （機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|